

高純度不飽和脂肪酸の高圧下熱分析

平松信康, 井上 亨*

(平成4年12月17日受理)

High Pressure Differential Thermal Analysis of Ultra-pure Unsaturated Fatty Acids

Nobuyasu Hiramatsu and Tohru Inoue*

(Received December 17, 1992)

The effect of hydrostatic Pressure on the polymorphic transformation and melting of *cis*-unsaturated fatty acids, palmitoleic acid(POA), oleic acid(OA), asclepic acid(APA), petroselinic acid(PSA) and erucic acid(EA), were investigated by means of a high-pressure differential thermal analysis. The temperature range of α form of OA and POA becomes wider as the pressure is increased, which is the same tendency as the high pressure phase of polyethylene. On the contrary, those of α_1 form of EA and high pressure crystallized α_p form of APA are narrowed by increasing pressure. This is similar trend to the hexagonal(rotator)phase of *n*-alkane. The values of ΔV on melting and conformational order-disorder transitions of ω chain were estimated from the Clausius-Clapeyron equation. The ΔV on γ - α transitions for POA, OA, and APA are almost the same(5.6-5.9 cm³/mol), but that on γ_1 - α_1 transition for EA is larger than those for the former acids. New polymorphs were formed for APA by the melt-crystallization under high pressure above about 110MPa.

1. はじめに

脂質はタンパク質や糖質などとならんで、生体を構成する代表的な物質であり、太古の昔から人類は食品油脂としてあるいは薬品や化粧品として利用してきた。一方生物学の観点では、生体中において脂質はエネルギー源として貯えられるだけでなく、細胞膜構成成分であり、

また生命を維持する上での代謝生理作用に深く関係した物質でもある。その脂質には脂肪酸が構成要素として含まれ、生体機能発現に重要な役割を演じていることが知られている。天然脂質のアシル鎖の約半数は不飽和鎖で占められ、不飽和脂肪酸は生体物質の基本単位の一つとして位置付けられる。それにもかかわらず、不飽和脂肪酸の構造や物性の研究は、高純度試料の精製が困難であったため、ほとんどなされていなかった。最近8-9年の間にバイオ技術を利用した分離精製技術の急速な進歩によって、高純度の試料が各種得られるようになり、物性研究の対象とすることが可能になった¹⁾⁻¹²⁾。長鎖有機化合物における純度の問題は、すでに*n*-アルカンなどにおいて指摘されているが¹³⁾、たとえ不純物が微量であっても相転移の存在そのものに影響を与えることがあり、マ

福岡大学理学部応用物理学科, *化学科:福岡市城南区七隈8-19-1 〒814-01

Department of Applied Physics, *Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University, Nanamuka 8-19-1, Jounan-ku, Fukuoka 814-01, Japan.

クロな量である熱力学諸量に対しても鋭敏に影響する。

生体中の脂質分子は多くの場合、分子集合状態が液晶構造のような柔構造となっているので、機能発現と深く関係した相転移の挙動が柔構造により不明確になったり複雑になったりする。そこで、これらの不明確さを取り除くために、まず、生体の基本単位の一つである不飽和脂肪酸単体の結晶多形挙動を中心に調べ、対称性の高い結晶状態における分子の構造的特徴を明確にすれば、その知見は柔構造における脂質の機能を分子レベルから理解するために役立つと考えられる。一般的に、結晶多形現象は、温度、圧力などの諸条件によってきわめて複雑な挙動をとる。温度による多形挙動への影響については多くの報告がなされているが¹¹⁻⁸⁾、圧力による影響についての系統だった報告は、*n*-アルカンの結晶-回転相-融液転移を対象としたものくらいで¹³⁾⁻¹⁶⁾、他の脂質についての報告はないに等しい。これは、圧力下の環境を作り出すのが比較的困難である事に起因すると思われるが、圧力は熱力学諸量としては温度と同様に重要なパラメータであることは言うまでもなく、また、1次の転移の場合は、結晶多形間転移の圧力依存性を調べることによって、圧力と共役な関係にある転移時の体積変化を見積もることも出来るので、圧力の研究には興味を持たれる。

本稿では、高圧下示差熱分析(DTA)装置の液体試料用測定セルを開発し¹⁷⁾、Fig.1に示すような不飽和脂肪酸でシス型2重結合を分子鎖中央付近に1つ持ったモノエン酸のうち、Table 1に示す分子鎖長の異なるいくつかの試料について、結晶多形の転移に伴う熱挙動に対する圧力効果を調べた最近の研究を紹介する。

2. ω 鎖におけるコンフォメーションの秩序-無秩序転移

上でも述べたように、脂質の本質的な属性として多形現象がある。脂質はいろいろな結晶多形を発現させるがいずれも長鎖分子の特質に従って分子鎖方向をおよその

厚さ(長面間隔)とするラメラ構造をとり、ラメラに垂直な面内の構造(サブセル)もいくつかの基本構造に分類される。さらに単位胞の中で分子鎖のコンフォメーションが完全な規則構造をとっているものもあれば、分子鎖のコンフォメーションに乱れを含む多形もある。不飽和脂肪酸において特に興味深いのが、これらのコンフォメーションの秩序-無秩序を伴った多形間転移である。

Table 1に示す脂肪酸のうち、ペトロセリン酸(PSA)を除く他の不飽和脂肪酸には、固相において、 Δ 鎖(カルボキシル基から2重結合までの分子鎖)の秩序構造を保持したままで、 ω 鎖(メチル基末端から2重結合までの分子鎖)のコンフォメーションが秩序構造から無秩序構造へと変化する転移が存在する。この転移が発現するための条件は、現在確認されている範囲では、 ω 鎖の炭素数が奇数の場合で、 ω 鎖が Δ 鎖と同じか、またはより短く、かつその鎖長の違いが炭素4つ以下の場合であるが、本質的なことはまだ不明であり、今後の検討が待たれる。

オレイン酸(OA)の、大気圧下での示差走査熱量計(DSC)による1°C/minの走査速度で得られたサーモグラムをFig.2に示す。低温側に出ている吸熱ピークが γ (秩序)- α (無秩序)転移に対応したものであり、高温側の吸熱ピークが α 型の融解によるものである¹⁾。その他の脂肪酸であるバルミトレイン酸(POA)¹⁰⁾やエルシン酸(EA)⁴⁾、アルクレピン酸(APA)⁶⁾においても、融液状態から1°C/

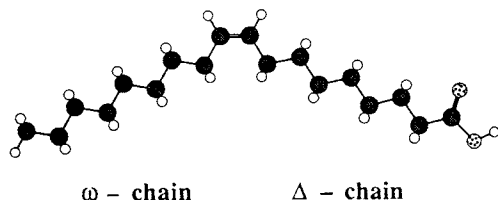


Fig.1 Molecular structure of *cis*-unsaturated fatty acid (oleic acid).

Table 1 *cis*-Unsaturated fatty acids

	Number of Carbon Atoms	Double Bond	Number of Carbon Atoms in ω -Chain	Number of Carbon Atoms in Δ -Chain
Palmitoleic Acid(POA)	16	1	7	9
Oleic Acid(OA)	18	1	9	9
Asclepic Acid(APA)	18	1	7	11
Petroselinic Acid(PSA)	18	1	12	6
Erucic Acid(EA)	22	1	9	13

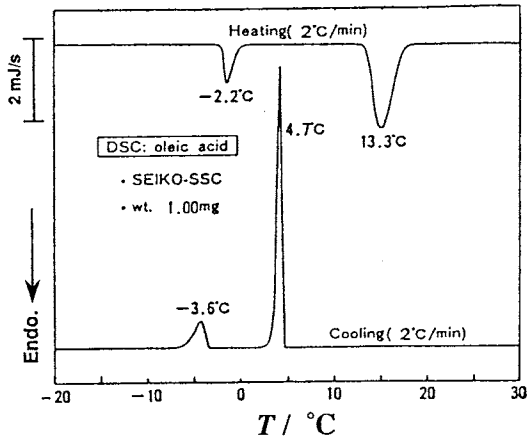


Fig.2 DSC thermogram of cooling and subsequent heating of oleic acid¹⁾.

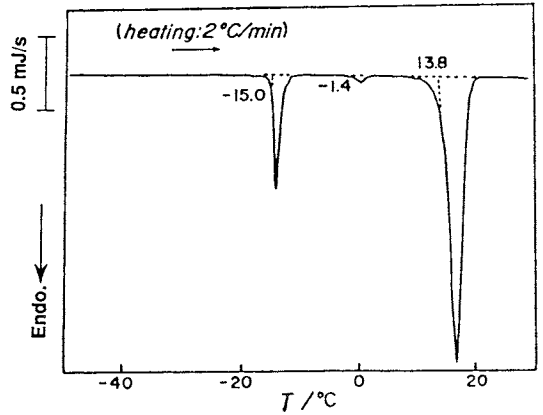


Fig.3 DSC heating thermogram of asclepic acid⁶⁾.

Table 2 Values of transformation temperatures, T , their pressure coefficients, dT/dp , and thermodynamic parameters for polymorphic transformation and melting of *cis*-unsaturated fatty acids at atmospheric pressure.

	T (°C)	dT/dp (K/MPa)	ΔV (cm ³ /mol)	ΔH (kJ/mol)
Oleic acid				
γ - α	-2.2	0.182	5.9	8.76
α -melt	13.3	0.211	29.2	39.6
Palmitoleic acid				
γ - α	-18.7	0.190	5.6	7.5
α -melt	2.0	0.202	23.6	32.1
Erucic acid				
γ_1 - α_1	9.0	0.239	7.5	8.9
α_1 -melt	34.0	0.212	35.3	51.0
Petroselinic acid				
HM-melt	30.5	0.231	36.2	47.5
Asclepic acid				
γ - α	-15.0	0.175	5.3	7.8
α - α'	-1.4	0.127	0.3	0.7
α -melt	13.8	0.204	28.3	39.8
γ_p - α_p	-32.5	0.214	-	-
α_p - α_p	-4.0	0.156	-	-

分程度の昇降温速度で温度を変化させたときのサーモグラムの形は基本的に変わらない。各脂肪酸の固相における ω 鎖秩序-無秩序転移と融解時の熱力学諸量を Table 2 に示す。

APA には Fig.3 に示すように、二つの吸熱ピークの間

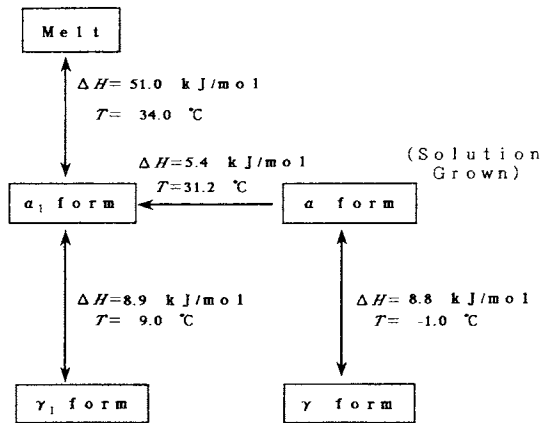


Fig.4 Transition circuit of erucic acid.

の温度に、小さな吸熱ピークが存在し、この転移は α - α' 転移と呼ばれている⁶⁾。したがって、最も高温に出現する大きな融解の吸熱ピークは α' 型の融解によることになる。この α' 型は、 α 型同様に ω 鎖が乱れた状態にあり、X線回折で調べても α 型と α' 型の構造には目立った相違が認められない。

EA では、Fig.4 に示すように、融液状態からの結晶化においては、前述の α 型とは結晶構造が異なった α_1 型ができ、さらに温度を下げると γ 型とは異なる γ_1 型へと転移をおこす。一方、溶液からの溶液媒介結晶化により α 型を得ることができ、この場合 α 型は温度を下げることによって γ 型へと転移する。 α 型および α_1 型では ω 鎖は無秩序構造をとり、 γ 型、 γ_1 型は秩序構造となっている⁴⁾。

PSA では、低融点型(LM)と高融点型(HM)の2つの結晶多形が報告されているが⁵⁾、HM型は、OAなどで見ら

れる α 型とサブセル構造は似ているが、 ω 鎖のコンフォメーションは無秩序ではない。溶解度の測定などによると、約18°Cを境に低温側ではLM型が、また高温側ではHM型が安定な相となることが知られている。しかし、実際の転移はその温度では起こらず、LM型が28.5°C付近で融解するに伴いHM型へ転移する。これら両型は融点が接近しているため、転移したHM型は直ちに融解する。

3. 転移温度の圧力依存性

大気圧下では以上のような多形転移挙動を示す不飽和脂肪酸の、圧力下での転移挙動を調べた結果の一例として、POAの昇温時の転移挙動をFig.5に示す。圧力下でも基本的にはサーモグラムの形は変わらずに転移温度が上昇している。吸熱ピークのピーク温度と圧力の関係をFig.6に示した。融解の圧力依存性が、 γ - α 転移のそれに比べて大きいので、 α 型の存在する温度範囲が圧力の上昇と共にいくぶん広がっていることがわかる。OAにおいても同様の傾向が見られた。一方、EAではFig.7に示すように、圧力の増加に伴って転移温度は上昇するが α_1 型の存在する温度範囲は狭くなっている。この傾向を外挿して α_1 型が消滅する圧力、温度を計算すると約550

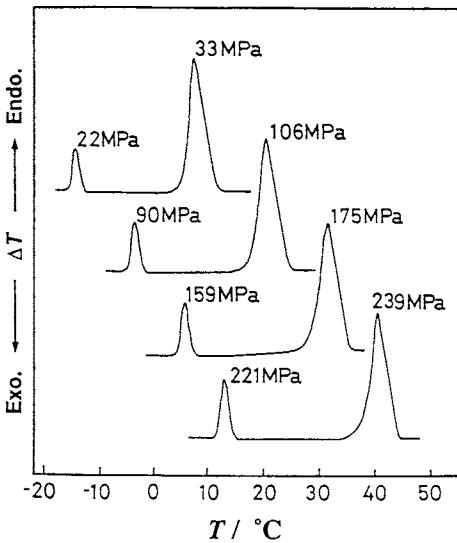


Fig.5 DTA heating thermograms obtained by heating the γ -form of palmiteic acid under various pressures¹⁰⁾. Pressures corresponding to two endothermic peaks are indicated in the figure. Because the pressurizing system is a closed system, the pressure increases somewhat with temperature due to the thermal expansion of the pressure transmitting fluid.

MPa, 約121°Cである。後に述べるAPAの高圧多形である α_p 型においても、圧力の増加に伴って α_p 型の温度範囲が狭くなる同様の傾向がある。

そもそも、 ω 鎖のコンフォメーションの秩序-無秩序転移は、カルボキシル基において水素結合を介して形成された脂肪酸2量体の両端部分にあたる ω 鎖のコンフォメーションが無秩序化するという点で、界面融解(interfacial melting)現象であると考えられている²⁾。他の界面融解現象の例としては、*n*-アルカンの結晶-回転相(六方晶相)転移が知られておりこの転移の圧力依存性についても比較的詳しく調べられている^{13),16)}。圧力の増加に伴って六方晶相は存在温度範囲が狭くなってゆき、鎖長により数10MPaから2~3MPaで消滅する。これはEAの α_1 型とAPAの α_p 型の傾向と一致する。一方、圧力の増加と共に存在温度範囲の広がる例としては、*n*-アルカンの高分子体であるポリエチレンで、約300MPa以上の圧力下で出現する高圧相がある¹⁸⁾。どの様なときに狭められ、あるいは広がる傾向となるかは、結局、クラウジウス-クラペイロンの式によればエントロピー変化 ΔS と体積変化 ΔV の兼ねあわせで転移温度の圧力依存性が決まるということから、少し乱れた固相(α 型や六方晶相高圧相)が、エントロピー変化や体積変化の観点で、融液状態と完全結晶状態の間のどこに位置するのかによって消滅か拡大かが決まると考えられる。転移に伴う体積変化についての詳しい議論は次節で行う。

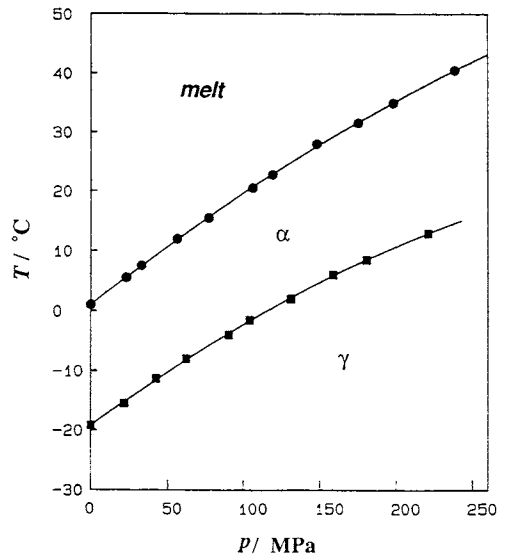


Fig.6 Pressure dependence of the γ - α transformation (■) and the α -melt transition (●) temperatures of palmiteic acid¹⁰⁾.

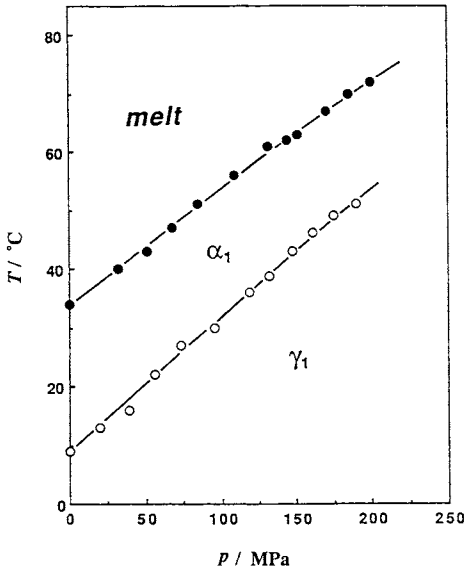


Fig.7 Variation of the γ_1 - α_1 transformation temperature(○)and the α_1 -melt transition temperature(●) of erucic acid with pressure¹¹⁾.

4. 転移に伴う体積変化

1次の相転移においては(1)式に示すクラウジウスークラペイロンの式が成り立つ。

$$dp/dT = \Delta S/\Delta V = \Delta H/(T \cdot \Delta V) \tag{1}$$

すでにn-アルカンでは、圧力下でのディラトメトリー法で転移時の体積変化(ΔV)と転移温度(T)、転移温度の圧力依存性(dT/dp)を測定し、大気圧下での転移の潜熱 ΔH を(1)式によって求め、カロリメトリー法で求めた ΔH と比較し、誤差範囲で一致することが報告されている¹⁴⁾。我々は、転移温度の dT/dp と T 、およびDSCより求めた ΔH を使い、転移時の ΔV を見積もってみた。その結果をTable 2に示す。

ΔV の絶対値測定は、直接測定法としてディラトメトリー法があるが、試料量が比較的多く必要であることや熱膨張による補正、相転移前後での熱膨張率の違い、転移が有限の温度範囲で起こるなどの理由により精度が上がらない。一方、圧力依存性とカロリメトリーによる体積変化測定法では、試料量は少量でよく、かつ圧力依存性は多数の測定点を使って最小2乗法で決定するので有効数字3桁程度、また転移温度も有効数字3桁は確保できるので、 ΔH を精度良く測定することができれば、かなり精度の良い ΔV 値を求めることが出来る。

各不飽和脂肪酸の転移に対応した大気圧付近の圧力依

存性(dT/dp)や(1)式によって得られた ΔV をTable 2に示した。

ω 鎖の秩序-無秩序転移について、分子鎖長と ΔV の関係について見てみることは興味深い。まず、 γ - α 転移に伴う ΔV は、OA、POA、APAのいずれの場合も5.6~5.9 cm^3/mol (APAは γ - α - α' 転移の総計)であり、 ω 鎖長がOAでは炭素数9で、POAやAPAでは7であるにもかかわらず、ほぼ等しい値となった。しかし、EAの γ_1 - α 転移においては7.5 cm^3/mol で、 ω 鎖長がOAと同じ炭素数9であるにもかかわらず、明らかに大きな値となった。一方、 ω 鎖の秩序相から融液までの体積変化の総計を分子鎖の全炭素数で割ってみると、すべての不飽和脂肪酸において、1.83~1.95 cm^3/mol となり、EAも他の脂肪酸と同様の値を得た。

振動分光の結果、EAの γ_1 - α_1 転移は、他の不飽和脂肪酸で見られる γ - α 転移と比べ、 ω 鎖の無秩序化の挙動が大きく異なることが報告されている⁸⁾。すなわち、 γ - α 転移では、転移温度で急激に ω 鎖の無秩序化が起こるのに対し、EAの γ_1 - α_1 転移では、転移温度のおよそ30℃低い温度から徐々に無秩序化が起こりはじめ、むしろ連続的に無秩序化が進行し、1次転移的でない振舞いをする。しかし、X線4軸自動回折計によって、単位胞体積の温度変化を測定して、転移時の体積変化を直接見積もってみると、熱膨張による補正などをして、7.1 cm^3/mol となり、1次の転移として(1)式を適用して求めた ΔV の値とほぼ一致することがわかった。

γ - α 転移に伴う ΔV は、両不飽和脂肪酸の対応する結晶多形で基本的な結晶構造が変わらないとすれば、主に ω 鎖のコンフォメーションの無秩序化の程度を反映したものであると考えられるが、OAとPOAで ΔV がほぼ同じ値となっているのは、 ω 鎖の無秩序化の程度が同程度であることを表し、両脂肪酸の ω 鎖の炭素数が2違うことを考慮すると、 α 型においては ω 鎖の部分融解がメチル末端を含む限られたところで起こっていることが示唆される。

5. アスクレピン酸における高圧結晶多形

APAにおいて圧力下で新しい結晶多形が出現する。各圧力下で融解状態から結晶化したものを出発試料として、同圧力下で昇温時の転移挙動を調べた結果をFig.8に示す。約100MPa以下の圧力下で見られる3つの吸熱ピークは、大気圧下での転移挙動の類推から⁶⁾、 γ - α 転移(↓)、 α - α' 転移(*), α' -融解によるものと結論できるが、約110MPa以上の圧力下においては γ - α 転移による吸熱ピークが消失し、低い温度のところ新しい吸熱ピーク(♠)が出現する。これは、約100MPa以上の圧力下で融液状態から結晶化すると新しい結晶多形ができるこ

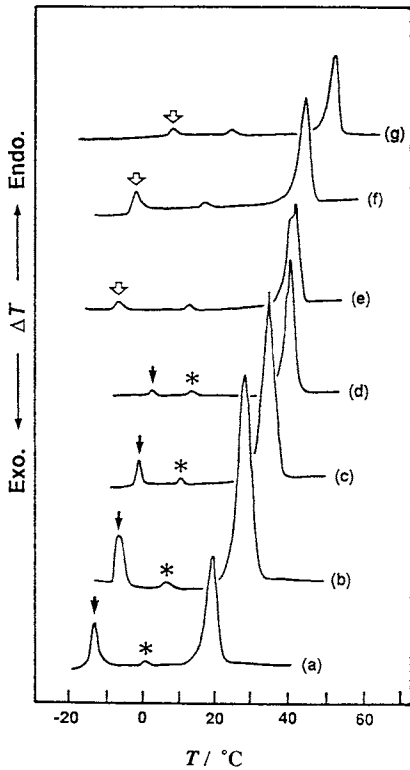


Fig.8 DTA heating thermograms for asclepic acid¹¹⁾. The samples were crystallized from the melt under pressure, and then heated at the same pressure. The pressures(in MPa)at which the lowermost temperature peak appeared are 11(a), 51(b), 89(c), 111(d), 120(e),135(f),and 185(g).

とを示している。そこで大気圧下で融解結晶化して、 γ - α -融液と転移することが分かっている試料を出発試料として100MPa以上の圧力下で昇温して転移挙動を調べること、100MPa以上の高圧下で融液状態から結晶化してできた結晶を十分に温度を下げた後に圧力を100MPa以下に下げて転移挙動を調べ、これらを比べてみた。前者の実験結果がFig.9で後者の結果がFig.10である。明らかに転移挙動が異なっていることがわかった。特に、高圧下で結晶化したものを出発試料とした大気圧下付近での昇温時の転移挙動は、本来の γ - α 転移温度よりもかなり低いところで吸熱が観測され、 α - α' 転移に相当すると考えられる小さな吸熱が出現した後、発熱を観測し、融解に相当する吸熱が現れた。この発熱が現れた温度より高温では、大気圧下で融解結晶化したものの転移挙動と同じ挙動をとることから、発熱を伴って α' 型へとモノトピックな転移をすることがわかった。新たにみつかった

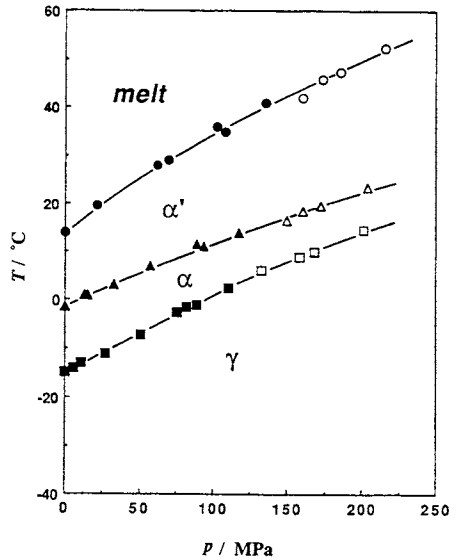


Fig.9 Plot of temperatures for γ - α transformation (□, ■), α - α_1 transformation(△, ▲), and α' -melt transition(○, ●)of asclepic acid as a function of pressure¹¹⁾. Filled symbols were obtained by cooling-heating cycles under given pressures(Fig.8), while open symbols were obtained by heating the samples crystallized at atmospheric pressure under elevated pressures.

結晶多形を、温度の低い方から γ_p 型、 α_p 型、 α'_p 型と名付けた。 γ_p 型は高圧下で出来るが、温度を十分に低く保つことで安定に大気圧下に取り出すことが出来る。また、 γ_p - α_p 転移は大気圧下付近においても可逆な転移であった。

6. おわりに

以上、いくつかの不飽和脂肪酸の結晶多形間転移挙動の圧力効果について紹介した。転移時の ΔV の計算は、コンフォメーションの乱れにより解析が困難であるために、X線回折による詳しい構造解析が完全ではない現在においては有用な情報を与える。また、APAでみられた高圧結晶多形の構造については、X線回折や振動分光法などによって、大気圧結晶多形との比較を行う必要があると考えられる。

また、生体に存在する脂肪酸はいろいろな分子鎖長のものが混在した混合系であり、その多形挙動は複雑であるが、ここに紹介した高純度の試料を用いて脂肪酸単体の多形挙動を明らかにしようとする試みは、次のステップとして脂肪酸2成分系あるいは3成分系の多形挙動へと発展拡張することにより、多成分系での複雑な転移挙動を説明することに貢献するものと期待される。

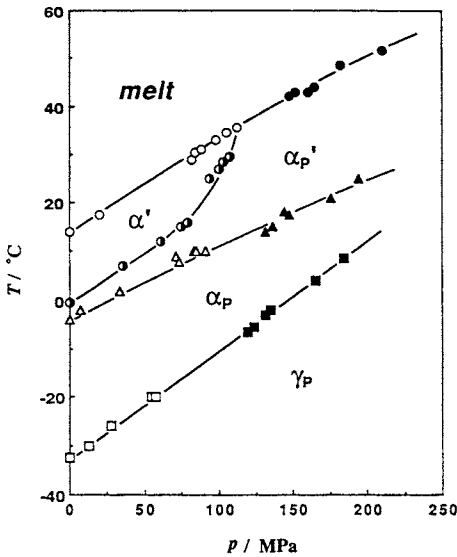


Fig.10 Pressure dependence of the transformation and melting temperatures of high-pressure polymorphs of asclepic acid. \square, \blacksquare ; γ_p - α_p transformation, $\triangle, \blacktriangle$; α_p - α_p' transformation, \bullet ; α_p' -melt transition, \circ ; α_p' - α' transformation, \circ ; α' -melt transition¹¹⁾. Filled symbols were obtained by cooling-heating cycles under given pressures(Fig.8). Open symbols and half-filled circles were obtained below 110 MPa by heating the samples crystallized above 110

謝 辞

本稿の我々の研究を遂行するにあたり、試料を提供して下さった日本油脂株式会社および共同研究者として議論や助言をしていただいた同社油化学研究所鈴木正夫氏、広島大学生物生産学部佐藤清隆教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) M. Suzuki, T. Ogaki and K. Sato, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**, 1600-1604 (1985).
- 2) M. Kobayashi, F. Kaneko, K. Sato and M. Suzuki, *J. Phys. Chem.* **90**, 6371-6378 (1986).
- 3) K. Sato and M. Suzuki, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **63**, 1356-1359 (1986).
- 4) M. Suzuki, K. Sato, N. Yoshimoto, S. Tanaka and M. Kobayashi, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1942-1947 (1988).
- 5) K. Sato, N. Yoshimoto, M. Suzuki, M. Kobayashi and F. Kaneko, *J. Phys. Chem.* **94**, 3180-3185 (1990).

- 6) N. Yoshimoto, M. Suzuki and K. Sato, *Chem. Phys. Lipids* **57**, 67-73 (1991).
- 7) K. Sato, M. Kobayashi, F. Kaneko, M. Suzuki and N. Sagi, in: V.K.S. Shukla(Ed.), *The Proceedings of 15th Scandinavia Lipid Symposium*, Lipidforum, Copenhagen, pp. 67-85 (1989).
- 8) F. Kaneko, K. Yamazaki, M. Kobayashi, K. Sato and M. Suzuki, *Rep. Progr. Polym. Phys. Japan* **34**, 367-370 (1991).
- 9) N. Hiramatsu, T. Inoue, M. Suzuki and K. Sato, *Chem. Phys. Lipids* **51**, 47-53 (1989).
- 10) N. Hiramatsu, T. Sato, T. Inoue, M. Suzuki and K. Sato, *Chem. Phys. Lipids* **56**, 59-63 (1990).
- 11) N. Hiramatsu, T. Inoue, T. Sato, M. Suzuki and K. Sato, *Chem. Phys. Lipids* **61**, 283-291 (1992).
- 12) N. Hiramatsu, T. Inoue, M. Suzuki and K. Sato, *Rep. Progr. Polym. Phys. Japan* **35**, 305-306 (1992).
- 13) K. Takamizawa, Y. Nagao, D. Irii and Y. Urabe, *Themochimica Acta* **88**, 205-210 (1985).
- 14) R. R. Nelson, W. Webb and J. A. Dixon, *J. Chem. Phys.* **33**, 1756-1764 (1960).
- 15) A. Wurlfingler and G. M. Schneider, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **77**, 121-128 (1973).
- 16) B. Koppitz and A. Wurlfingler, *Colloid and Polym. Sci.* **252**, 999-1000 (1974).
- 17) N. Hiramatsu and T. Inoue, *Rev. Sci. Instrm.* **59**, 671-672 (1988).
- 18) M. Yasuniwa, C. Nakafuku and T. Takemura, *Polym. J.* **5**, 526-533 (1973).

要 旨

パルミトレイン酸(POA)やオレイン酸(OA), アスクレピン酸(APA), ペトロセリン酸(PSA), エルシン酸(EA)などのシス型不飽和脂肪酸について、多形間転移と融解の挙動に対する圧力の影響を高圧下示差熱分析を用いて調べた。OAやPOAの α 型の存在温度範囲は圧力と共に広がる傾向を示し、ポリエチレンの高圧相の挙動と似ている。一方、EAの α_1 型やAPAの α_p 型は圧力の増加と共に存在温度範囲が狭くなり、*n*-アルカン回転相の挙動と似ている。多形間転移や融解時の体積変化 ΔV を、転移温度の圧力依存性と転移エンタルピーのデータを用いてクラウジウス-クラペイロンの式から見積り、POAやOA, APAの γ - α 転移時の ΔV はほぼ同じ値(5.6-5.9cm³/mol)となるが、EAにおける γ_1 - α_1 転移では他の脂肪酸にくらべて大きな値となった。その他、APAでは高圧下で新しい結晶多形が出現することもわかった。